

行政院農業委員會林務局 100年度 委託研究(辦理)計畫

桃花心木保健食品之開發研究

開發桃花心木葉天然保肝指標成分及其毒性試驗(3/4)

**Liver Damage Protective Constituent and Toxicity Test
of *Swietenia macrophylla* (L.) Jacq. Leaves (III)**

期末報告



計畫編號:100-00-5-9

委託機關：行政院農業委員會林務局

執行機關：中國醫藥大學 臨床醫學研究所

中國醫藥大學附設醫院 中醫藥轉譯研究中心

計畫主持人：楊 玲 玲 教授

中 華 民 國 一 百 年 十 二 月 三 十 日

目 錄

摘要	2
壹、計畫前言	3
貳、計畫工作項目	4
參、材料與方法	5
一、實驗材料	5
二、實驗方法	6
1. 大葉桃花心木葉大量採集之鑑定及乾燥	6
2. 大葉桃花心木葉之甲醇萃取物之丙酮劃分部指標成分萃取及分離	7
3. 指標成分薄層層析(TLC)分析	7
4. 指標成分保肝活性指標成分測定	7
5. 活性指標成分之 HPLC 指紋圖譜分析:	8
6. 連續餵食 28 天毒性試驗：體重分析無毒性顯示劑量及小鼠口服給藥方式	8
7. 細菌基因突變試驗	8
肆、結果與討論	11
一、大葉桃花心木葉之甲醇萃取物之丙酮劃分部指標成分分離及分析	11
二、活性指標成分之自由基清除活性測試	13
三、活性指標成分之 28 天餵食毒性試驗體重分析	15
四、細菌基因突變試驗	14
伍、結論	23

摘要

國人肝臟疾病罹患率甚高，慢性肝病及肝硬化為十大死亡原因之第六位，統計資料顯示造成肝臟疾病之主要因素有病毒性、酒精性與化學性三大類。於前二期研究結果顯示大葉桃花心木葉之有效保肝萃取劃分部為甲醇萃取物之丙酮劃分部，顯示其有開發為保健食品之潛力及經濟價值，為確保療效及安全性以開發新保肝營養指標成分為有意義之研究。有效保肝指標成分以甲醇萃取物之丙酮劃分萃取物經色層分析建立，以確保未來之療效準則。本年度計畫之重點在(1)大量分離大葉桃花心木葉之指標成分，進行鑑定及指紋圖譜分析;及(2)毒性測試指標成分為加強肝功能評估之完整性，且依照前計畫之結果大葉桃花心木葉甲醇萃取物之丙酮劃分部在抑制肝脂質過氧化試驗及在以四氯化碳 (CCl₄) 誘導大鼠急性肝損傷的動物實驗模式之肝病理切片中顯示口服粗萃取物(100 mg/kg)比正對照組silymarin (400mg/kg)顯示有更好的保護現象。利用生物技術及依衛生署健康食品法之規定開發大葉桃花心木成為天然保肝及抗氧化健康食品，以利桃花心木資源之利用，並有助於推廣桃花心木造林，厚植森林資源及提升附加價值。

關鍵字: 大葉桃花心木、葉、肝損傷、活性物質、肝毒性、基因毒性

Key word: *Swietenia macrophylla*, liver damage, principle substance, liver toxicity, gene toxicity,

壹、計畫前言

根據衛生署九十九年六月二日公告之最新統計數據，在台灣每年約有五千人死於肝癌，四千人死於肝硬化和慢性肝炎，甚至於從民國七十年以來，肝癌一直國人死亡癌症的第二位，此外，慢性肝病治療過程中，服用大量藥物皆經過肝臟代謝，長期服用藥物與放射線治療所造成的藥物性肝損害，亦為肝病的主要原因之一。藥物性肝炎引發的機制極為複雜，不同藥物種類，引發肝病的機制亦不相同，本計畫分離出有效保護被傷害的肝細胞膜的大葉桃花心木葉之萃取物及其毒性試驗，例如：來自活氧物質 (Reactive oxygen species, ROS) 或自由基 (Free radical) 對肝臟所引起的損害。當肝臟攝取過多的脂肪、蛋白質、酒精、環境汙染與服用藥物，皆會產生大量的活性氧，促使肝臟進行氧化反應。ROS 與自由基會攻擊肝細胞上的細胞膜，而進行脂質過氧化反應。肝臟的氧化反應和脂質過氧化反應是因為拮抗其作用的抗氧化劑不足以發揮其抗損傷作用，導致細胞受損，從而產生更多的活性氧物質，使脂質過氧化進一步增強，形成惡性循環(Giuseppe Poli *et al.*, 1987)。

由前計畫結果大葉桃花心木葉甲醇萃取物之丙酮劃分部含有豐富的總多酚含量，它是一種良好的抗氧化劑，酚類含量的多寡則影響活氧物質被移除的效果。自然界中超過 4000 種不同的酚類可以抵抗老化所帶來的疾病 (A.L.K. Faller and E. Fialho, 2010)，植物多酚還具有抗腫瘤、可萃取其中的類黃酮製成藥物。以 Silymarin 為例子(E. Shaker *et al.*, 2010)，在臨床試驗過程中，以 8 個星期為療程，用以治療肝臟中毒的患者，共觀察 2637 個病例，雖然療程的時間很短，但有 88% 的病患獲得改善，而且該藥劑十分安全，只有 0.8% 的病患副作用 (Kenneth Flora *et al.*, 1998)。Par 在 1992 年也提出 silymarin，能用以保護酒精對肝臟的傷害(Albert Parés *et al.*, 1998)。事實上，研究類黃酮化合物對肝臟保護功能的文獻很多，例如：Cholbi 以四氯化碳(CCl₄)誘發試驗老鼠肝硬化後，添加類黃酮化合物於老鼠的飲水中實驗，他們發現許多老鼠因此而沒有肝硬化的現象，因而篩選出多種具保肝功能的類黃酮化合物 (Iris Erlund, 2004)。因此類黃酮含量多寡，可能影響護肝效果，本實驗藉由總黃酮含量測定大葉桃花心木葉之甲醇萃取物之丙酮劃分部之類黃酮含量及組織病理切片，藉以評估類黃酮化合物與護肝活性之關係。大葉桃花心木於樹幹部份已有廣泛應用，唯枝葉利用於養生醫療效果尚待開發，本研究延續前計畫之方法，大量分離大葉桃花心木葉之甲醇萃取物之丙酮劃分部，並以甲醇沖提流經 Sephadex LH20 管柱，分別收集並以抗氧化能力為指標，建立有效保肝活性的指紋圖譜。大量分離大葉桃花心木葉之甲醇萃取物之丙酮劃分部並同時進行毒性測試，探討桃花心木有效成分之特性。

貳、計畫工作項目

一、期中工作項目

1. 大葉桃花心木葉之甲醇萃取物之丙酮劃分部指標成分分離
2. 大葉桃花心木葉之活性指標劃分之鑑定
3. 甲醇萃取物之丙酮劃分部活性指標成分之指紋圖譜分析
4. 口服給藥 28 天餵食毒性試驗：體重分析及毒性試驗

二、期末工作項目

5. 繼續低劑量小鼠口服給藥 28 天餵食毒性試驗：體重分析
6. 活性指標劃分部血清生化值測定及形態組織病理檢驗統計分析
7. 細菌基因突變試驗
8. 細胞毒性測定 (Trypan blue assay)
9. 姊妹染色分體互換頻率分析

參、材料與方法

一、實驗材料

1. 植物材料

本計畫桃花心木葉採自台灣南投地區，由南投縣魚池鄉林葉試驗所蓮華池研究中心-孫正春先生鑑定來源。其葉片，在 40°C 下，以鼓風方式進行乾燥。

2. 試藥及試劑

- (1) DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) (Sigma, Germany)
- (2) Gallic acid (Sigma, Germany)
- (3) 試藥級甲醇 (Merck, Germany)
- (4) Dimethyl sulfoxide (DMSO) (Sigma, France)
- (5) 二次水
- (6) 2,4,6-Tris(2-pyridyl-s-triazine) (TPTZ) (Sigma, Switzerland)
- (7) Sodium acetate, anhydrous (CH_3COONa) (J. T. Baker, U.S.A.)
- (8) Acetic acid (J. T. Baker, U.S.A.)
- (9) Iron(III) chloride hexahydrate ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) (Sigma, Germany)
- (10) Trolox (Sigma, U.S.A.)

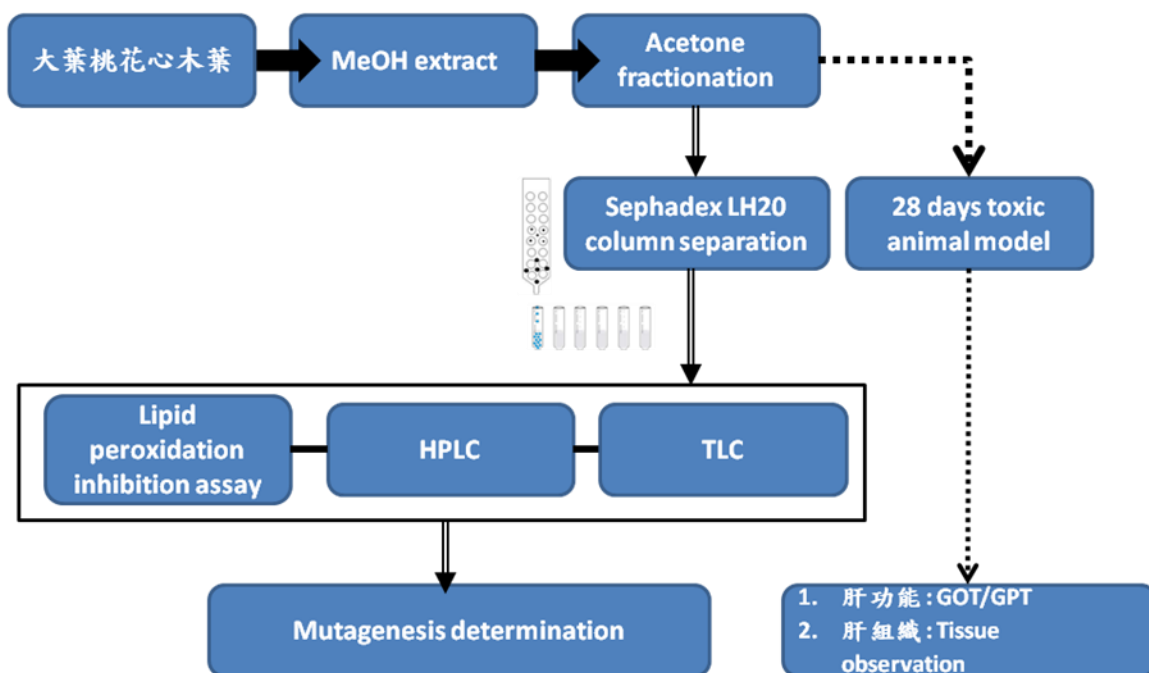
3. 儀器

- (1) 低溫迴流水浴萃取鍋 (6 Channel, WB6P)
- (2) 恆溫鼓風乾燥機 (中全儀器, CH-100)
- (3) 旋轉減壓濃縮機 (Eyela, SB-1000)
- (4) 酵素免疫分析儀 (*ELISA reader*) (μ -Quant, Bio-Tek instruments, INC.)
- (5) 電子天秤 (AND, FX-200)
- (6) 電子混合器 (MS-1000, Digisystem LAB. Instruments, INC.)

- (7) 微量滴管 (Nichiryo)
- (8) 96 孔細胞培養盤 (Falcon)
- (9) 圓底萃取瓶 (Eyela)
- (10) 冷凍真空乾燥機 (Savant, SVC100H)

二、實驗方法

本計畫施行如圖一所示，大葉桃花心木葉依照前計畫研究結果進行 MeOH 抽取及 acetone 劃分出有效保肝成分後，本計畫以 28 天餵食小數最大劑量分析肝功能變化以及 Sephadex LH20 管柱分離出 6 個沖提液進行 TLC、HPLC 指紋圖譜及 LPO 保護分析得到有效成分劃分部(期中計劃)後，進行連續餵食 28 天毒性試驗，致突變試驗 (mutagenicity determination assay)及基因毒性測試。



圖一、說明開發桃花心木葉天然保肝指標成分及其毒性試驗之流程

1. 大葉桃花心木葉大量採集之鑑定及乾燥

本計畫桃花心木葉採自台灣南投地區，由南投縣魚池鄉林業試驗所蓮華池研究中心-孫正

春先生鑑定來源。其葉片，在 40°C 下，以鼓風方式進行乾燥。

2. 大葉桃花心木葉之甲醇萃取物之丙酮劃分部萃取及分離

(1) 大量萃取

依據前計劃將大葉桃花心木葉進行乾燥及粉碎(600g)，以 10 倍體積之甲醇浸泡一夜後再放入水浴鍋裡加熱迴流萃取四小時。過濾後的葉再次加入新的甲醇迴流萃取四小時，共兩次八小時。合併濾液減壓濃縮之甲醇萃取物後經丙酮溶劑劃分進行保肝分析，取得有效 56 保肝植物營養素(phytochemical)。

(2) Sephadex LH20 膠體管柱分離

利用 Sephadex LH 20 膠體管柱層析，以甲醇溶劑沖提甲醇萃取物之丙酮劃分部，得到不同劃分部成分配合以高壓液相層析儀分析並進行成分分離。以 MeOH 流經 Sephadex LH20 膠體管柱，每 30 分鐘(50 mL)收集一管，不同收集液(E1-E6)覆蓋後置於室溫待測。

3. 指標成分薄層層析(TLC)分析

以薄層層析(Rf-TLC)分析 Sephadex LH20 膠體管柱之不同收集液(E1 - E6 管)。使用移動相(Ethyl acetate : n-butanol:formic acid:H₂O=5:3:1:1)泳動分析保肝萃取物經 silica C60 TLC 片上分析。TLC 片以 FeCl₂ 及 conc. H₂SO₄ 呈色。不同劃分部成分及呈色分析甲醇萃取物之丙酮劃分部活性指標成分，依呈色分析法所得之資訊取出各個薄層層析成分測定有效體外保肝活性之測定活性部分

4. 指標成分保肝活性指標成分測定

高壓液相層析儀分析膠體管柱(Sephadex LH 20)分離之 E1-E6 並進行成分分析。依 DPPH 清除自由基能力分析所得之資訊取出各個甲醇沖提之膠體管柱層析成分測定有效體外保肝活性之測定活性部分。保肝活性之測定 (LPO inhibitory index) 以保護肝臟粒線體脂質過氧化為基準，另外補充抗氧化力評估(DPPH radical scavenging、ferrous ion chelating、superoxide anion radical scavenging、superoxide anion radical inhibition 及 ferric reducing ability)以確保保肝抗氧化活性。保肝活性 (LPO inhibitory index) 之測定乃將動物肝臟粒線體經蛋白質定量後，使用誘導劑誘導氧化並加入樣品培養 1 小時後加入 TBA(thiobarbituric acid) 反應後再加入 Methanol-NaOH solution 終止反應並在波長 532 nm 下測量吸光值，用

以判斷肝臟脂質過氧化的程度。丙二醛(malondialdehyde, MDA)為脂質過氧化的最終產物，我們藉由觀察丙二醛含量的多寡可以用來評估個體受到氧化傷害的程度。抑制脂質過氧化計算如下，為公式一：

$$\text{Inhibition effect percentage} = [(C-A)/(C-B)] \times 100\%$$

A = average of **sample** MDA(TBA)₂ value at 532 nm

B = average of **blank** MDA(TBA)₂ value at 532 nm

C = average of **control** MDA(TBA)₂ value at 532 nm

蛋白質濃度之測定之實驗參照 Lowry 等(1951)之方法進行。取適量蛋白質樣品，並以 1 N NaOH 來調整使其最終體積為 100 μL，加入 200 μL 去離子水及 100 μL 反應混合液(25 % Na₂CO₃: 2% Na-K-tartrate : 1% CuSO₄ = 8 : 1 : 1, v/v/v)，然後在室溫下靜置 10 分鐘，加入 1 ml Folin reagent (Folin : H₂O = 1 : 19.5)後於 37 °C 水浴 20 分鐘，並在室溫下冷卻，最後在分光光度計以 660 nm 下測其吸光值(25 °C)。然後將標準曲線做線性回歸，得一方程式，將所得樣品之吸光值代入此一元一次方程式，換算後即可得知樣品之蛋白質含量。

利用 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH)清除自由基能力分析方法如下述公式，為公式二。:

$$(\% \text{ of decoloration}) = 1 - \frac{\text{absorbance of compound/extract}}{\text{absorbance of blank}} \times 100$$

5. 活性指標成分之 HPLC 指紋圖譜分析：

以高壓液相層析儀 (UV-HPLC) 分析甲醇溶劑沖提之 300 mL (50mL/管)大葉桃花心木葉之甲醇萃取物之丙酮劃分部溶劑液。指標成分之指紋圖譜利用高壓液相層析儀(Shimadzu LC-10ATvp multi-solvent delivery system equipped with a Shimadzu LC auto-injector)及全光譜偵測儀(Shimadzu SPD-M10A photodiode-array detector)分離及分析。分離出的訊號高低(OD280nm)以軟體(Shimadzu Class-VP chromatography data system)計算底面積後計算。分析管柱為 reversed-phase column(LiChroCART® 100 RP-18e; 4.6 mm × 250 mm, 5 μm, Merck)，移動相溶液 water-methanol (10-90 % 梯度沖提)，流速 1 mL/min，分析 20 1 樣品，總時間為 60 min。

6. 連續餵食 28 天毒性試驗：

劑量及給藥方式：公、母和對照組 ICR 小鼠各 5 隻口服活性物 10 及 20 mg/Kg/day 對照組給水

- (1) 紀錄體重變化：在餵食開始後開始測量體重，每天測定一次體重變化及存活率。
- (2) 進行血清肝功能測定：GOT/GPT 值。
- (3) 肝外觀分析若有不正長則需進行組織切片觀察。

7. 細菌基因突變試驗

(1) 毒性試驗 (toxicity test)

在致突變試驗中，若樣品對菌株具有毒性，會使菌數降低，而造成實驗結果誤判。故先進行LPO之毒性試驗，以評估 活性物 active sample是否會影響菌株之生長。首先取 10、50及 100 µg/plate 樣品液、0.1 mL 磷酸緩衝溶液和 0.1 mL 經隔夜培養於 oxid nutrient broth No.2 之菌種 *S. typhimurium* TA98、TA100 菌液於試管中，加入 0.5 mL 磷酸緩衝液，於 37 °C 下預培養 20 分鐘，取出進行稀釋，再取 1 mL 稀釋液於培養皿中，加入 nutrient agar 搖勻，凝固後，置於 37 °C 培養箱倒置培養 48 小時並計數其菌落數。

(2) 致突變試驗 (mutagenicity determination assay)

致突變性分析採用 Maron 和 Ames (1983) 所提出的方法進行。取活性物 10、50及 100 µg/plate 及 0.1 mL 磷酸鹽緩衝液和 0.1 mL 經隔夜培養於 oxid nutrient broth No.2 之菌種 *S. typhimurium* TA98、TA100 菌液於試管中，加入 0.5 mL 磷酸緩衝液，於 37 °C 下預培養 20 分鐘，加入 2 mL molten top agar (含0.05 mM L-histidine、0.05 mM biotin 及 0.09 M NaCl) 混勻後倒入 glucose minimal agar plate，於 37 °C 倒置培養 48 小時並計數其菌落數。

8. 細胞基因毒性試驗

(1) 材料:細胞株：Chinese Hamster Ovary cells (CHO-K₁) (CCRC 60006)，購自食品工業發展研究所生物資源保存及研究中心。

(2) 細胞毒性測定 (Trypan blue assay)

調整 CHO-K₁ 細胞數，取 1mL 細胞懸浮液至 flask，以 F-12 完全培養液，培養於恆溫培養箱中 (5% CO₂, 37 °C) 24 小時，以 PBS 清洗二次，加入新的培養液，內含 100 µg

濃度之活性物樣品，反應 30 分鐘，將細胞收集後，取出 20 uL 細胞液，加入等體積之染劑 (Trypan blue stain)，混合均勻，取 15 uL 細胞混合液至血球計數器 (Hemocytometer)，於顯微鏡下觀察並計數細胞數。死細胞經由染色後會呈藍色 (Duthie *et al.*, 1997)。細胞存活率 (%) = [未染色細胞數 / (染色細胞數 + 未染色細胞數)]。

9. 姊妹染色分體互換頻率分析

調整細胞數，將細胞懸浮液移至 flask，以 F-12 完全培養液，培養於恆溫培養箱中 (5 % CO₂, 37 °C) 24 小時，再以 100 µg 濃度之樣品處理 24 小時，於此步驟同時加入 S9 及其輔助因子 NADP 及 G6P。於 24 小時後將培養基移除，再以 PBS 清洗三次，加入新的培養液，之後，加入 0.1 mL BrdU 溶液，使最後濃度為 10 uM，以黑色袋子包住培養瓶，置於培養箱 (37 °C, 5 % CO₂) 培養 48 小時。加入 0.1 mL colcemid 使濃度為 0.2 µg/mL，反應 2 小時後，將細胞培養液倒入離心管內，離心 (800 rpm, 10 min)，取出上清液，加入新的培養液，混勻細胞，加入 4~8 mL 0.075 M KCl，置於培養箱中 8 min，離心 (800 rpm, 10 min)，取出上清液，加入新的培養液，混勻細胞，加入 1 mL 固定液 (methanol : acetic acid = 3:1)，離心 (800 rpm, 10 min)，取出上清液，加入新的培養液，以混勻細胞，再加入 1 mL 固定液，離心 (800 rpm, 10 min)，取出上清液，加入新的培養液，以混勻細胞，反覆數次，最後一次離心完成後，取出上清液，留下少許固定液，混勻細胞，再將細胞液滴於載玻片上，之後，將載玻片置於烘乾器上烘乾。烘乾後之載玻片以 Hoechst 33258 溶液 (2.5 µg/mL) 染色 10 min，再以 PBS 清洗，蓋上蓋玻片，以紫外光照 1 小時。之後，載玻片浸泡於蒸餾水水中，使蓋玻片滑落，載玻片以 65 °C buffer 溶液浸泡 15 min，再以蒸餾水清洗，以 3 % Giemsa 染色 15 min，沖洗後烘乾，於顯微鏡下觀察。

肆、結果與討論

一、大葉桃花心木葉之甲醇萃取物之丙酮劃分部指標成分分離及分析

1. 有效快速分離有效保肝物:

依照前期計畫萃取大葉桃花心木葉之甲醇萃取物之丙酮劃分部指標成分之方法進行有效成分分離。大量採集大葉桃花心木葉分別加入 10 倍體積的甲醇溶劑萃取，經減壓濃縮後得總重約 150 g。此萃取物再經丙酮 (Acetone) 溶劑萃取，總萃取液在 40°C 下以減壓濃縮儀進行濃縮及抽乾，得總重約 55 g。

2. Sephadex LH20 膠體管柱分離

利用 Sephadex LH20 膠體管柱層析大葉桃花心木葉之甲醇萃取物之丙酮劃分部 (約 100 mg)，以甲醇溶劑沖提得到不同劃分部成分。計算總樣品回收率約為 80 - 85%。

3. 薄層層析(TLC)呈色分析

薄層層析(Rf-TLC)分析 Sephadex LH20 膠體管柱之不同收集液(E1-E6 管)。利用移動相 (Ethyl acetate : *n*-butanol : formic acid : H₂O = 5:3:1:1)極性-非極性之特性分離樣品內成分，偵測方式以(a)Ferrous Chloride Test 針對含有 phenolic hydroxyl 官能基的成分(如 flavonoid, flavonol 等)及(b) Liebermann Burchard's test 以 conc. H₂SO₄ 噴灑後加熱得到具有 triterpenoid saponin 或 Steroid saponin 類成分。由圖二所列出的 TLC 分析圖，顯示甲醇萃取物及甲醇萃取物之丙酮劃分部分別都有三團不同極性成分之劃分部成分，回顧之前的成分研究及抗氧化力價之結果應以 flavonoid 類成分居多(Olajuyigbe OO, *et al.*, 2011; Bradley W. Bolling, *et al.*,2011)。濃縮後的 E1-E6 的 TLC 結果顯示濃度稀少，隨後以 HPLC 觀察其成分分布情形(圖三)。

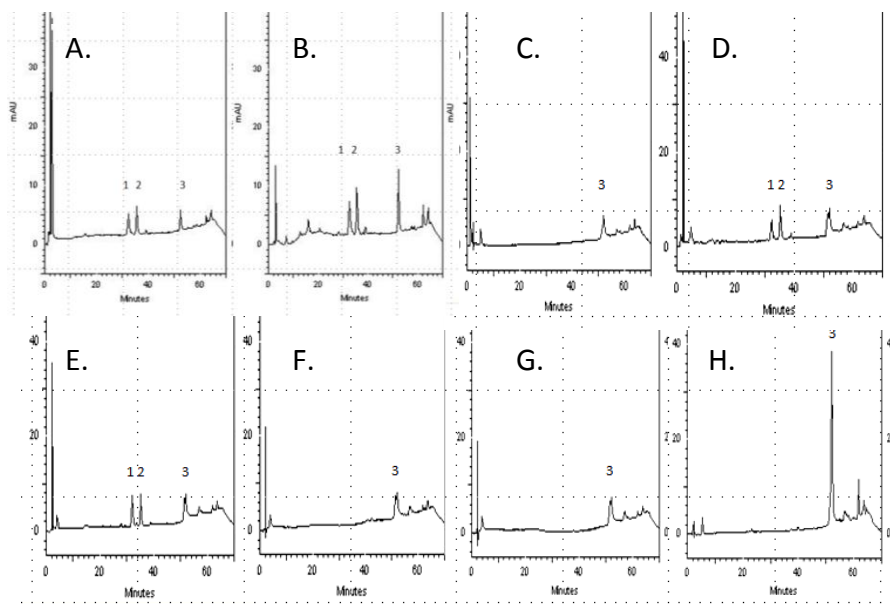
4. HPLC 指紋圖譜

Sephadex LH20 膠體管柱之收集液(E1 - E6 管)以 HPLC 分析得到指紋圖譜。由指紋圖譜中可發現有三根主要吸收峰(peak 1, 2, 3)，互相比較大葉桃花心木葉之甲醇萃取物及大葉桃花心木葉之甲醇萃取物之丙酮劃分部並無極大差異(圖三 A & B)。不過，HPLC 分析管柱甲醇沖提之 E1-E6 可以發現 peak 1, 2, 多分布於較大的分子群中(圖三 D-E)，而 peak 3 則分布於 E6 屬於小分子(圖三 H)。

MeOH	MeOH-A cetone	Residue In MeOH	E1	E2	E3	E4	E5	E6

MeOH	MeOH-A cetone	Residue In MeOH	E1	E2	E3	E4	E5	E6

圖二、TLC 分析 MeOH 沖提 Sephadex LH20 管柱劃分成分，以二種試驗法
(上)Ferrous chloride test (下) Liebermann Burchard's test



圖三、HPLC 分析大葉桃花心木葉之甲醇萃取物(A)及其甲醇萃取物之丙酮劃分部(B)之三根主要吸收峰指標成分，並比較 Sephadex LH20 膠體管柱之收集液(E1-E6 管)之指紋圖譜(C-H)，吸光偵測波長為 282nm，分析方法如實驗步驟中所說明。

二、活性指標物之自由基清除活性測試

在進行分離有效保肝活性之大葉桃花心木葉之甲醇萃取物之丙酮劃分部之前後，以測定 total phenol/ flavonoid/ flavonol 為基本。由表一所列出可比較出含有大量的 total flavonoid。這結果也與 TLC 的 FeCl_2 呈色反應的結果相呼應。在自由基清除活性的研究上，較常被使用的是 DPPH，這是一種穩定的自由基可以接受電子或者氫原子 (Gutteridge, 1993)，本計畫中用來評估抗 Sephadex LH20 沖提液的不同大小分子群以快速了解清除自由基能力。參考 Miliauskas 等 (2004) 之方法，將大葉桃花心木葉之甲醇萃取物(A)及其甲醇萃取物之丙酮劃分部於 96 孔盤內配成濃度為 200 mg/mL，將各劃分部與 DPPH 進行混合 (1:1)，DPPH 在波長 517 nm 下有較強的吸光值 (Lamaison *et al.*, 1991)，並以 Gallic acid 作為標準品。Gallic acid 在前二次計畫報告中提過其作用，且常用來測試多酚類的含量 (Slinkard *et al.*, 1977; Fiuza *et al.*, 2004)。依照樣品清除自由基造成吸光值的降低可藉此算出清除率，吸光值越低表示抗氧化物質之還原力越強(表二)。

表一、比較大葉桃花心木葉之甲醇萃取物、甲醇萃取物之甲醇劃分部及其丙酮劃分部，及 Sephadex LH20 膠體管柱之收集液 (E1-E6 管) 之保肝有效成分 total phenol/flavonoid/flavonol 相對含量。(N=3)

Extracts	total phenol contents	total flavonoid contents	total flavonol contents
Assay unit	Gallic acid equivalent (µg/mg)	Rutin equivalent (µg/mg)	EGCG equivalent (µg/mg)
甲醇萃取物	219.91±10.02	31.58±0.95	65.35±1.65
甲醇萃取物之甲醇劃分部	199.15±1.62	13.23±0.48	64.57±1.34
甲醇萃取物之丙酮劃分部	357.41±40.34	81.75±3.81	101.10±1.57
E2 + E3	56.06±0.83	5.29±1.99	12.12±0.53
E6	12.63±1.58	0.00±0.00	2.58±0.19

表二、大葉桃花心木各溶劑萃取部之抗氧化活性測試之比較 (N=3)

Extracts	Assays ^a					
	LPO Inhibitory effect	DPPH Radical scavenging	ferrous ion chelating	superoxide anion radical scavenging	superoxide anion radical inhibition	ferric reducing ability
Assay unit	IC ₅₀ ^b (µg/mL)	EC ₅₀ (µg/mL)	EC ₅₀ (µg/mL)	EC ₅₀ (µg/mL)	IC ₅₀ ^a (µg/mL)	Trolox equivalent (µg/mg)
甲醇萃取物	13.62±2.52	7.00±0.49	> 200	81.39±2.88	>200	124.91±2.71
甲醇萃取物之 甲醇劃分部	50.75±5.62	7.85±0.33	> 200	79.81±2.73	>200	117.72±2.55
甲醇萃取物之 丙酮劃分部	9.31±2.57	4.12±0.16	> 200	48.9±1.67	>200	128.84±1.79
E2 + E3 ^c	ND	35.10±0.68	ND	ND	ND	ND
E6 ^c	ND	> 50.00	ND	ND	ND	ND
Gallic acid		1.04±0.32				

^a, 一般常用之抗氧化活性測試。LPO Inhibitory effect 為 FeCl₂ 誘發肝臟粒線體產生脂質過氧化(LPO, lipid peroxidation); DPPH,指 DPPH radical scavenging 的實驗

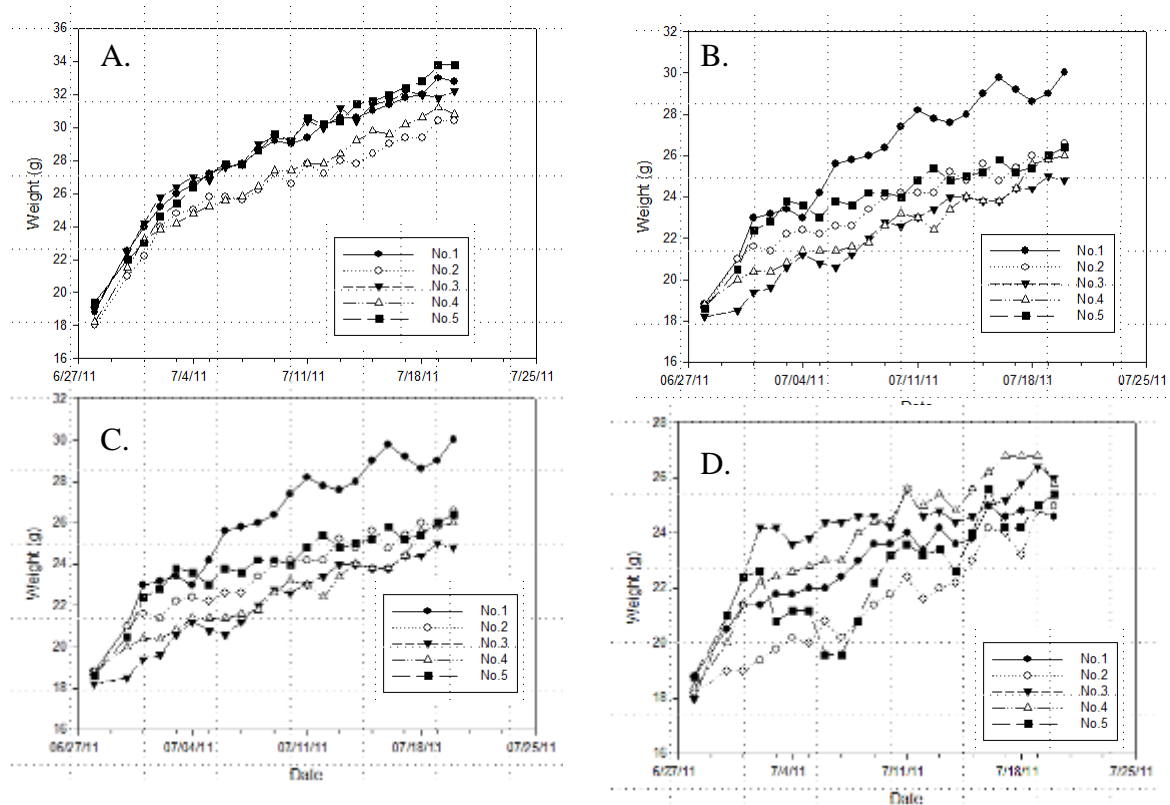
^b, IC₅₀ 為抑制率達 50%時之濃度 (微克/毫升)

^c, 甲醇萃取物之丙酮劃分部的 Sephadex LH20 甲醇沖提液以 E 代表。收集 E2, E3, E6 進行活性測試，檢測這主要的三根吸收峰分開(如表)以及合併((E2+E3):E6=1:1)之 DPPH 活性 (EC₅₀ = 26.14 µg/mL, n=1) ND, no-detection

篩選大葉桃花心木葉之甲醇萃取物之丙酮劃分部具有非常好的自由基清除活性(表二、DPPH assay)的部分，其抑制率達百分之五十的濃度皆在每毫升 4.12 ± 0.11 微克以下，只需極少量的萃取物就可以達到相當好的效果。標準品Gallic acid是一種純的多酚化合物，抑制率達百分之五十的最低濃度是每毫升1.04微克，但是初步用Sephadex LH20所分離出的E2, E3, 以及E6所顯示的DPPH清除率較原來差，E6似乎不是主要有效抗氧化成分，這份結果顯示經純化之有效保肝成分則減少。此顯示大葉桃花心木葉之有效成分為甲醇萃取物之丙酮劃分部。

三. 活性指標成分之 28 天餵食毒性試驗體重分析

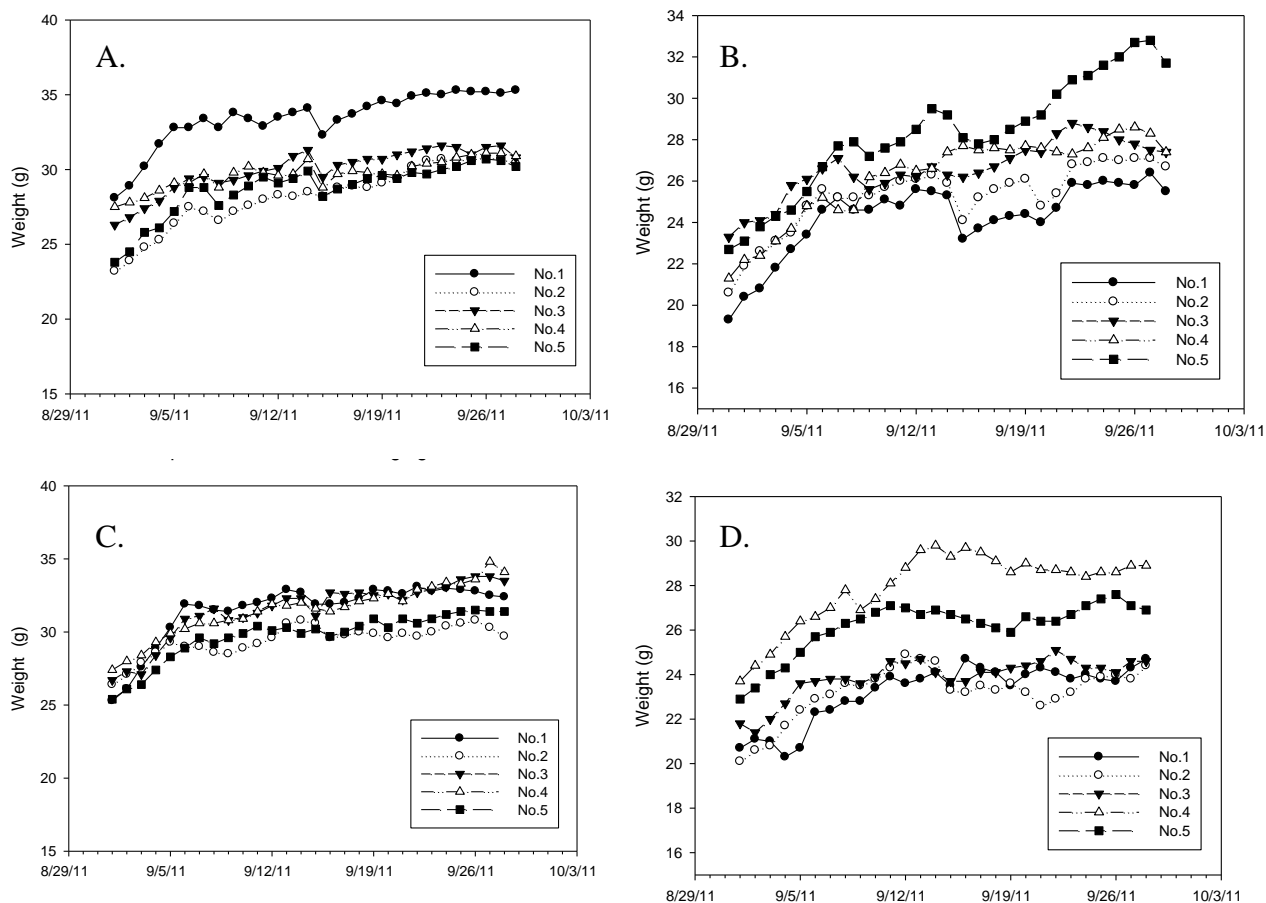
本計畫進行小鼠餵食有效成分為甲醇萃取物之丙酮劃分物二種劑量毒性測試，由下圖表示劑量(10, 及 20 mg /Kg/day)的體重變化。實驗結果呈現無毒性現象，控制組之小鼠的體重變化與實驗組的趨勢相同(圖四、五)。



圖四. 記錄每日餵食大葉桃花心木葉甲醇-丙酮劃分部之小鼠體重變化(10mg/kg/day)。(A)雄性小鼠控制組(B) 雌性小鼠控制組(C) 雄性小鼠對照組(D) 雌性小鼠對照組 (N=5)

表三、小鼠 28 天毒性試驗之血液生化值(N=5)

10mg/K g/day	IU/L	Creatinine	Uric Acid	Cholesterol	TG	GOT	GPT
Male	Control	0.00 ±0.00	0.51 ± 0.18	137.60 ± 18.15	118.00 ± 14.64	108.00 ± 21.87	56.29 ± 13.73
	Blank	0.00 ±0.00	0.34 ± 0.24	77.88 ± 84.46	66.32 ± 73.08	64.94 ± 60.90	35.01 ± 30.09
Female	Control	0.06 ± 0.10	0.48 ± 0.23	90.60 ± 9.48	95.60 ± 18.83	85.50 ± 17.33	38.67 ± 6.08
	Blank	0.00 ± 0.00	0.25 ± 0.08	60.16 ± 36.53	51.35 ± 31.97	49.24 ± 23.78	26.28 ± 11.14
20mg/K g/day	IU/L	Creatinine	Uric acid	Cholesterol	TG	GOT	GPT
Male	Control	0.0 ± 0.00	1.5 ± 1.00	117.7 ± 20.2	147.4 ± 16.6	122.0 ± 9.2	27.2 ± 8.7
	Blank	0.0 ± 0.00	0.6 ± 0.20	124.0 ± 8.0	148.0 ± 31.2	122.7 ± 13.6	26.0 ± 7.7
Female	Control	0.0 ± 0.00	0.5 ± 0.20	100.0 ± 21.7	72.7 ± 9.3	88.0 ± 11.0	18.4 ± 7.8
	Blank	0.0 ± 0.00	0.9 ± 0.30	90.7 ± 14.0	66.7 ± 2.3	86.0 ± 16.7	20.0 ± 5.7



圖五. 記錄每日餵食大葉桃花心木葉甲醇-丙酮劃分物之小鼠體重變化(20mg/kg/day)。(A)雄性小鼠控制組(B) 雌性小鼠控制組(C) 雄性小鼠對照組(D) 雌性小鼠對照組 (N=5)

四. 細菌基因突變試驗

在抗致突變試驗中，若樣品對菌株具有毒性則會導致菌數降低而誤認為樣品具有抗致突變性，因此，在進行抗致突變試驗前必須先進行毒性試驗以評估樣品對菌株是否有影響。根據 Waleh 等人 (1982) 指出，鼠傷寒沙門桿菌之殘菌數必須維持約對照組的 80% 以上，方可判定樣品對鼠傷寒沙門桿菌沒有毒性效應。由表四結果可知，在所添加的濃度下對TA98之毒性試驗中與對照組相較並無顯著性差異，顯示在此濃度下並不會造成TA98菌株的死亡，亦即對TA98無細胞毒性效應。

其表五顯示有效成分為甲醇萃取物之丙酮劃分物在所添加的濃度下(10、50及 100 $\mu\text{g}/\text{plate}$)對TA100之毒性試驗中與對照組相較並無顯著性差異，顯示在此濃度下並

不會造成TA100菌株的死亡，亦即對TA100無細胞毒性效應，綜合上述，LPO 在測試劑量範圍內，均不會導致 TA98 與 TA100 的存活率下降，菌數亦維持對照組之 80% 以上，因此繼續探討有效成分為甲醇萃取物之丙酮劃分物的致突變性可以此最高濃度100 µg 進行其安全性之探討。

表四、有效成分為甲醇萃取物之丙酮劃分物對 *Salmonella typhimurium* TA98 之毒性試驗 (N=3)

Sample (µg/plate)	No. of bacteria/plate (survival, %)*
0	1306 ± 27 (100.0) ^a
10	1357 ± 38 (103.9) ^a
50	1311 ± 49 (100.4) ^a
100	1256 ± 54 (96.2) ^a

* Values in parentheses are percentages relative to control value (100 %). Data bearing same superscript letters within a column are not significantly different ($p < 0.05$).

表五、有效成分為甲醇萃取物之丙酮劃分物對 *Salmonella typhimurium* TA100 毒性試驗 (N=3)

Sample (µg/plate)	No. of bacteria/plate (survival, %)*
0	1516 ± 21 (100.0) ^a
10	1598 ± 22 (105.4) ^a
50	1581 ± 68 (104.3) ^a
100	1464 ± 46 (96.6) ^a

* Values in parentheses are percentages relative to control value (100 %). Data bearing same superscript letters within a column are not significantly different ($p < 0.05$).

藉由毒性試驗之結果，再進一步探討樣品對菌株是否具有致突變性，以選擇適當的濃度來評估其抗致突變性。根據 Ames 等 (1975) 提出，樣品所誘導的 His⁺ revertants 數目若高於自發性突變菌落數 (spontaneous revertants) 兩倍以上，表示樣品具有致突變性。表六為有效成分為甲醇萃取物之丙酮劃分物對 TA98 菌株之致突變試驗，由結果顯示在所測試的濃度下(10、50 及 100 µg/plate)其回復菌落突變數與自發性突變菌落數 (Spontaneous revertants) 相較，不論有無添加鼠肝混合物(±S9)均無顯著性差異，顯示此濃度下無造成突變之安全性疑慮。

表六、有效成分為甲醇萃取物之丙酮劃分物對 *Salmonella typhimurium* TA98 之致突變試驗 (N=3)

His ⁺ revertants/plate (mutagenicity ratio) [*]		
Sample (µg/plate)	-S9	+S9
Spontaneous revertants	39 ± 4 (1.00) ^{a**}	39 ± 4 (1.00) ^a
10	32 ± 2 (0.82) ^a	43 ± 9 (1.10) ^a
50	40 ± 4 (1.02) ^a	38 ± 2 (0.97) ^a
100	31 ± 7 (0.79) ^a	44 ± 8 (1.12) ^a

^{*} The no. of spontaneous revertants was determined without sample. Data are means ± SD of three plates. Mutagenicity ratio = induced revertants per plate/spontaneous revertants per plate.

^{**} Data bearing same superscript letters within a column are not significantly different ($p < 0.05$).

表七為有效成分為甲醇萃取物之丙酮劃分物對 TA100 菌株之致突變試驗，由結果顯示在所測試的濃度下其回復菌落突變數與自發性突變菌落數 (Spontaneous revertants) 相較，不論有無添加鼠肝混合物(± S9)均無顯著性差異，顯示此濃度下對 *Salmonella typhimurium* TA98 與 TA100 並無造成突變之安全性疑慮。因此可初步判斷在此濃度範圍有效成分為甲醇萃取物之丙酮劃分物是安全的萃取物。

表七、有效成分為甲醇萃取物之丙酮劃分物對 *Salmonella typhimurium* TA100 之致突變試驗 (N=3)

Sample ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	His ⁺ revertants/plate (mutagenicity ratio) [*]	
	-S9	+S9
Spontaneous revertants	139 \pm 13 (1.00) ^{a**}	139 \pm 13 (1.00) ^a
10	141 \pm 7 (0.97) ^a	144 \pm 11 (0.94) ^a
50	150 \pm 10 (0.90) ^a	147 \pm 12 (0.88) ^a
100	154 \pm 12 (1.06) ^a	151 \pm 11 (0.98) ^a

* The no. of spontaneous revertants was determined without sample. Data are means \pm SD of three plates. Mutagenicity ratio = induced revertants per plate/spontaneous revertants per plate.

** Data bearing same superscript letters within a column are not significantly different ($p < 0.05$).

五、細胞基因毒性試驗

表八為有效成分為甲醇萃取物之丙酮劃分物對真核細胞 (CHO-K₁ cells) 細胞毒性及基因毒性之影響，由表中可看出有效成分為甲醇萃取物之丙酮劃分物在 100 μg 濃度範圍對 CHO-K₁ cells 之存活率皆為 95 % 以上，且姊妹染色體交換頻率與空白組並無顯著性差異，顯示在此劑量下並不會對細胞造成細胞毒性及基因毒性之效應。因此有效成分為甲醇萃取物之丙酮劃分物不論在原核或真核細胞的測試系統下可初步視為一安全性的萃取物。圖 6 為 blank 組，則圖 7 為添加 100 μg 組，兩者相較與(如表八) 並不呈顯著性差異。

表八、有效成分為甲醇萃取物之丙酮劃分物對 CHO-K₁ 存活率及姊妹染色體互換頻率之影響(N=3)

Concentration (ug/mL)	Survival % [*]	SCEs/cell
0	100 ± 1.1 ^{a**}	5.50 ± 0.83 ^a
100	95. ± 3.2 ^a	5.34 ± 0.51 ^a

*The viability was $[\text{nonstained cells}/(\text{stained} + \text{nonstained cells})] \times 100$. The high viability % indicated a high live cells. Each value is expressed as mean ± SD (n=3).

**Values within a column with the different superscripts are significantly different (p<0.05).

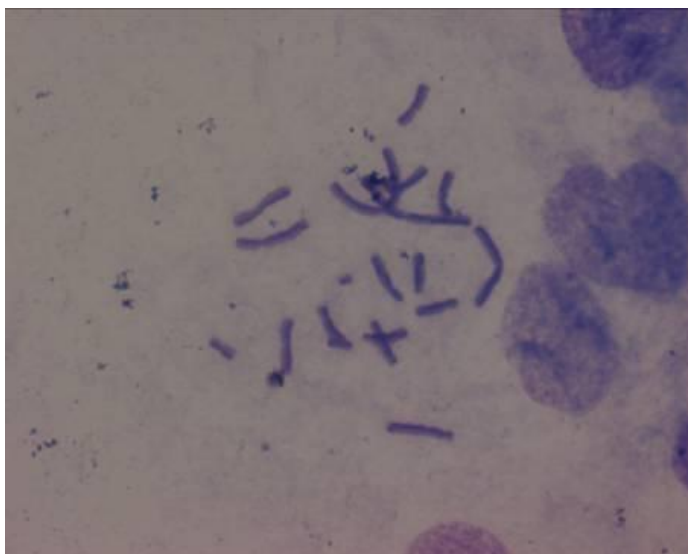


圖 6. blank 組之細胞核內染色體染色圖。

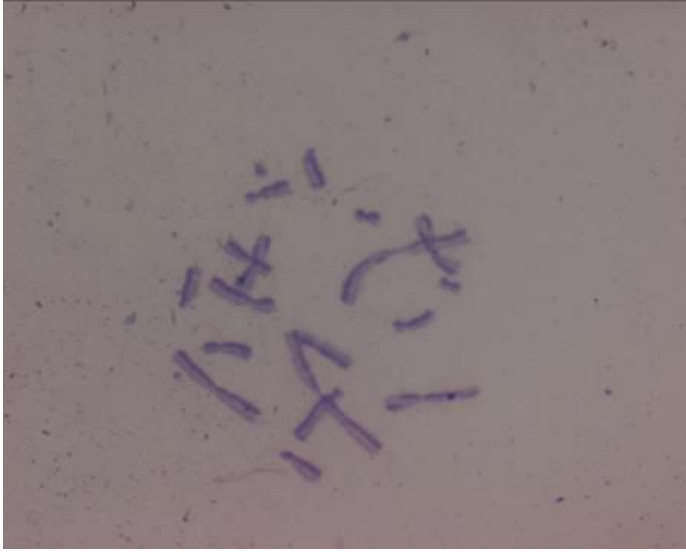


圖 7. 為添加 100 ug 桃花心木甲醇之丙酮劃分部之細胞核內染色體染色圖。

伍、 結 論

延續前二期的計畫發展大葉桃花心木葉之保肝及抗氧化力研究，本計劃已証實甲醇萃取物之丙酮劃分物為有效保肝物，同時進行小鼠 28 天餵食毒性試驗(體重，死亡率，肝功能，肝之形態及病態以及致突變和基因毒性試驗，評估成為保肝健康食品之推廣。計劃至今，在甲醇萃取物之丙酮劃分部有效分離物為未來開發之主要活性物質。動物毒性試驗已完成二種劑量，未有動物死亡亦無肝功能及肝之形態不正常之毒性。長時間給予甲醇萃取物之丙酮劃分部與未給予，其老鼠之血液生化數值顯示並無顯著性之差異，且同性別間之生化數值也無顯著性之差異。另，亦不會對細胞造成細胞毒性及基因毒性之效應及對 *Salmonella typhimurium* TA98 與 TA100 並無造成突變之安全性疑慮。因此可初步判斷在此濃度範圍有效成分為甲醇萃取物之丙酮劃分物是安全的萃取物。

陸、期中簡報審查意見回覆表

審查意見	意見回覆
結果與討論之表2中($\mu\text{g/ml}$)	修改 $\mu\text{g/mL}$
結果與討論之篩選大葉桃花心木葉之甲醇萃取物之丙酮劃分部具有非常好的自由基清除活性(表二、DPPH assay)的部分，其抑制率達百分之五十的濃度皆在每毫升7.03微克以下	結果與討論之篩選大葉桃花心木葉之甲醇萃取物之丙酮劃分部具有非常好的自由基清除活性(表二、DPPH assay)的部分，其抑制率達百分之五十的濃度皆在每毫升 4.12 ± 0.11 微克以下

柴、參考文獻

- Albert Parés, Ramón Planas, Miguel Torres, Joan Caballería, Josep M. Viver, Doroteo Acero, Juliá Panés, Joaquim Rigau, Justiniano Santos, Joan Rodés. Effects of silymarin in alcoholic patients with cirrhosis of the liver: results of a controlled, double-blind, randomized and multicenter trial. *Journal of Hepatology*, 1998, 28, 615-621.
- A.L.K. Faller, E. Fialho. Polyphenol content and antioxidant capacity in organic and conventional plant foods. *Journal of Food Composition and Analysis*, 2010.
- Ames, B.N., McCann, J. and Yamasaki, E. 1975. Methods for detecting carcinogens and mutagens with the Salmonella/mammalianmicrosome mutagenicity test. *Mutation Research*. 31: 347-364.
- Bradley W. Bolling, C.-Y. Oliver Chen, Diane L. McKay and Jeffrey B. Blumberg, Tree nut phytochemicals: composition, antioxidant capacity, bioactivity, impact factors. A systematic review of almonds, Brazils, cashews, hazelnuts, macadamias, pecans, pine nuts, pistachios and walnuts *Nutrition Research Reviews*, 2011, 1-32
- E. Shaker, H. Mahmoud, S. Mnaa. Silymarin, the antioxidant component and Silybum marianum extracts prevent liver damage. *Food and Chemical Toxicology*, 2010, 48, 803-806.
- Fiuza S. M., Gomes C., Teixeira L. J., Girão da Cruz M. T. Cordeiro M.N.D.S., Milhazes N., Borges F. and Marques M. P. M., *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 2004, 12, 3581-3589.
- Giuseppe Poli, Emanuele Albano, Mario U. Dianzani. The role of lipid peroxidation in liver damage. *Chemistry and Physics of Lipids*, 1987, 45, 117-142.
- Gutteridge J. M. *Free Radic. Res. Commun.* 1993, 19, 141.
- Iris Erlund. Review of the flavonoids quercetin, hesperetin, and naringenin. Dietary sources, bioactivities, bioavailability, and epidemiology. *Nutrition Research*, 2004, 24, 851-874.
- Kenneth Flora, Martin Hahn, Hugo Rosen, Kent Benner. Milk thistle (Silybum marianum) for the therapy of liver disease. *The American Journal of Gastroenterology*, 1998, 93, 139-143.
- Lamaison J. I., Ptijean-Freytet C. and Carnet C. A. *Pharm. Acta. Helv.* 1991, 66, 185.
- Maron, D. M. and Ames, B. N. 1983. Revised methods for the salmonella mutagenicity test. *Mutation Research*. 113: 173-215.
- Olajuyigbe OO, Afolayan AJ., Phenolic content and antioxidant property of the bark extracts of *Ziziphus mucronata* Wild. subsp. *mucronata* Wild. *BMC Complement Altern Med.* 2011 Dec 16;11(1):130.

Slinkard K. and Singleton V. L. *American Journal of Enology and Viticulture*. 1977, 28, 49-55.

Waleh, N. S., Rapport, S. J. and Mortelmans, K. E. 1982. Development of a toxicity test to be coupled to the Ames Salmonella assay and method of construction of the required strains. *Mutaiont Research*. 97: 247-256.